



REC'D 11 MAR 2005

WIPO PCT

# BREVET D'INVENTION

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 27 DEC. 2004

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

**DOCUMENT DE PRIORITÉ**

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint-Petersbourg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr

MINISTÈRE DE L'ÉCONOMIE

ÉTABLISSEMENT PUBLIC NATIONAL

CRÉÉ PAR LA LOI N° 51-444 DU 19 AVRIL 1951





26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI

**INPI**  
N° 11354\*03

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE page 1/2

**BR1**

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DE 540 • W / 210502

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>24 DEC 2003</b> LIEU <b>75 INPI PARIS 34 SP</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0315360</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE PAR L'INPI <b>24 DEC. 2003</b>		<b>1 NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b> BECKER ET ASSOCIES 35 rue des Mathurins 75008 PARIS	
<b>Vos références pour ce dossier (facultatif)</b> B0247FR			
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b>		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i> <i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N° _____ Date _____ N° _____ Date _____	
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/> N° _____ Date _____	
<b>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b> Méthode d'identification et de préparation de lymphocytes T régulateurs/suppresseurs, compositions et utilisations.			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ <input type="checkbox"/> S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»	
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input checked="" type="checkbox"/> <b>Personne morale</b> <input type="checkbox"/> <b>Personne physique</b>	
Nom ou dénomination sociale		ASSISTANCE PUBLIQUE, HOPITAUX DE PARIS	
Prénoms			
Forme juridique		Etablissement public	
N° SIREN		_____	
Code APE-NAF		_____	
Domicile ou siège	Rue	3, Avenue Victoria	
	Code postal et ville	75 010 014 PARIS	
	Pays	France	
Nationalité		Française	
N° de téléphone (facultatif)		N° de télécopie (facultatif)	
Adresse électronique (facultatif)			
<input type="checkbox"/> S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»			

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page



# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE  
page 2/2

BR2

REMISE DES PIÈCES **31 DEC 2003** Réservé à l'INPI  
DATE  
75 INPI PARIS 34 SP  
LIEU  
N° D'ENREGISTREMENT  
0315360  
NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI

DB 540 W / 210502

<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b>	
Nom	BECKER
Prénom	Philippe
Cabinet ou Société	BECKER ET ASSOCIES
N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel	97-0800
Adresse	Rue
	Code postal et ville
	Pays
N° de téléphone (facultatif)	01 53 43 85 00
N° de télécopie (facultatif)	01 53 43 85 05
Adresse électronique (facultatif)	becker@becker.fr
<b>7 INVENTEUR (S)</b>	
Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques	
Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes	<input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b>	
Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation)	
Établissement immédiat ou établissement différé	<input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat <input type="checkbox"/> Établissement différé
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)	Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>	
Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence): AG <span style="border: 1px solid black; padding: 0 10px;">  </span>	
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b>	
<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences	
Le support électronique de données est joint	<input type="checkbox"/>
La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe	<input type="checkbox"/>
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes	
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)</b>	
BECKER Philippe CPI N°97-0800	
<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b>	

**Méthode d'identification et de préparation de lymphocytes T  
régulateurs/suppresseurs, compositions et utilisations.**

La présente invention concerne les domaines de la biologie, de la génétique et de la  
5 médecine. L'invention décrit des méthodes et compositions permettant l'identification et  
la production de cellules ou lymphocytes T supprimeurs (Ts) et l'utilisation desdits  
lymphocytes Ts pour contrôler in vivo des conditions pathologiques variées, incluant des  
maladies associées à une activité anormale des lymphocytes effecteurs. L'invention  
concerne la préparation de telles compositions à base de lymphocytes Ts et leur  
10 utilisation dans le cadre de thérapies cellulaires et/ou géniques. Les compositions ou  
populations cellulaires à base de lymphocytes Ts obtenues dans le cadre de l'invention  
sont en particulier adaptées au traitement des tumeurs, des maladies auto-immunes, des  
allergies, de la maladie du greffon contre l'hôte, des effets greffe contre infection (GVI)  
ou greffe contre leucémie (GVL), des maladies inflammatoires, du diabète de type I, des  
15 infections virales ou bactériennes, à la reconstitution immune ou à l'induction d'une  
tolérance en cas de transplantation de cellules souches, tissus ou organe chez un  
mammifère.

L'existence dans le système immunitaire de cellules capables d'avoir des fonctions  
20 régulatrices/suppressives a été suspectée depuis longtemps. Dans les années 80, de  
nombreuses publications scientifiques ont montré l'existence d'activités suppressives au  
sein de la population lymphocytaire T. Cependant, l'impossibilité de caractériser et  
d'isoler des cellules portant une telle fonction à partir de la population lymphocytaire  
globale, qui possède par ailleurs de nombreuses autres fonctions incluant notamment  
25 celles de fonction effectrice, n'a pas permis de mieux comprendre ce phénomène. À  
partir de 1995, une sous-population de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> exprimant le marqueur  
CD25 a été identifiée chez les rongeurs comme jouant un rôle majeur dans le contrôle  
des réponses immunes et des maladies auto-immunes. Ces cellules T CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>  
appelées cellules T régulatrices ou suppressives (Ts) représentent chez la souris environ  
30 5-10 % des cellules T CD4<sup>+</sup>. Les cellules Ts expriment un récepteur T spécifique pour  
l'antigène, comme les autres lymphocytes T, mais leur action globale est en partie non-  
spécifique avec la possibilité de recruter d'autres lymphocytes T supprimeurs

additionnels par un phénomène nommé "infectious suppression". Chez l'homme, une population cellulaire régulatrice CD4+/CD25+, qui représente moins de 5 % des cellules T CD4+, a également été décrite.

5 Plusieurs expériences ont maintenant clairement établi le potentiel thérapeutique des lymphocytes T suppresseurs CD4+/CD25+ dans de nombreuses maladies.

10 Ainsi, les cellules Ts jouent un rôle majeur dans le contrôle des maladies auto-immunes telles que le diabète de type I ou la maladie du greffon contre l'hôte (GVH) induites par les lymphocytes T allogéniques. L'addition de cellules Ts à des greffons contenant des cellules souches hématopoïétiques allogéniques et des lymphocytes T effecteurs peut contrôler la survenue ou l'émergence de la GVH. L'injection de cellules Ts peut réduire la réponse auto-immune dans les polymyosites auto-immunes (non publié). Les cellules Ts jouent aussi un rôle majeur pour l'établissement ou l'induction d'une tolérance lors de la transplantation de tissus ou d'organes et/ou en présence de molécules  
15 immunogéniques telles que des transgènes (non publié). Les cellules Ts jouent également un rôle important dans la modulation de la réponse aux agents infectieux, et notamment aux bactéries intra-cellulaires et aux virus.

20 Les cellules Ts jouent un rôle dans plusieurs maladies inflammatoires telles que l'athérosclérose. Dans ce cas, l'absence ou la réduction du nombre de cellules Ts conduit à une accélération du développement de la maladie et à une augmentation de sa sévérité (résultats non publiés).

25 Les cellules Ts sont également importantes au cours de la vaccination puisqu'elles peuvent supprimer le développement d'une réponse immune spécifique. De même, la déplétion ou la réduction du nombre de cellules Ts améliore très sensiblement les effets d'une vaccination anti-cancéreuse. En utilisant un modèle murin tumoral, il a été montré que la déplétion des cellules Ts aboutit souvent au rejet de tumeurs.

30 Finalement, de nombreuses publications font maintenant état de la présence d'un nombre ou d'un pourcentage anormal de cellules Ts qui se manifestent dans le cadre de pathologies variées, et lors de l'évolution d'une maladie donnée.

Tous ces arguments montrent que l'identification, la sélection, l'expansion ou la déplétion des lymphocytes T régulateurs CD4+/CD25+ in vitro ou in vivo représentent un énorme potentiel diagnostique et thérapeutique pour de nombreuses pathologies et en particulier pour les maladies auto-immunes, les maladies inflammatoires, les maladies infectieuses, le cancer et les rejets de greffe.

La caractérisation des cellules Ts revêt ainsi une importance majeure. Bien que peu d'éléments soient connus concernant l'homéostasie et la régulation de cette population de lymphocytes Ts, il apparaît que le facteur de transcription Foxp3 joue un rôle important dans le développement et le fonctionnement des lymphocytes T suppresseurs CD4+/CD25+. Il n'est pas établi que Foxp3 est exprimé sur toutes les cellules Ts mais l'absence d'expression de Foxp3 chez la souris est corrélée à une perte dramatique des fonctions des cellules Ts, tandis que l'expression forcée de Foxp3 dans des lymphocytes T effecteurs transforme ces derniers en cellules Ts.

Bien que les marqueurs CD4 et CD25 caractérisent une population de cellule qui contient les lymphocytes T suppresseurs, il est important de noter que les fonctions suppressives ne sont pas entièrement portées par les cellules CD4+/CD25+ et surtout que toutes les cellules CD4+/CD25+ ne sont pas suppressives. En effet, CD25 est un marqueur également exprimé par les cellules T effectrices activées. L'identification et la purification des cellules Ts sur la base d'un tel marqueur est un problème majeur puisqu'elles présentent le risque d'identifier et de purifier en réalité des cellules T effectrices activées. Dans le cadre d'une pathologie immunologique donnée, les lymphocytes T activés exprimant CD4 et CD25 ont de grande probabilité de contenir justement les T effecteurs contre lesquels une intervention thérapeutique est souhaitable. Ainsi l'utilisation de CD4 et CD25 dans un cadre diagnostique (identification) ne serait pas fiable, et dans un cadre thérapeutique (purification, injection) ferait encourir le risque d'être inefficace voire de majorer la pathologie.

Le meilleur marqueur actuellement connu comme susceptible de différencier les cellules Ts des lymphocytes T effecteurs activés est l'expression du facteur de transcription Foxp3. Cependant, ce facteur de transcription intra-cellulaire n'est pas utilisable dans le

cadre de simples méthodes d'identification et de purification immunophénotypiques. D'autres marqueurs tels que CD62 permettent de mieux caractériser les cellules Ts mais ils sont loin de permettre une identification parfaite. De plus, plusieurs publications ont montré qu'il existait des activités suppressives au sein de la population CD4+/CD25- de même que dans certaines cellules CD8+. Il apparaît donc que l'utilisation diagnostique et thérapeutique des cellules Ts est clairement dépendante de leur identification propre et que les connaissances actuelles n'ont jusqu'à ce jour décrit aucun marqueur spécifique des lymphocytes T suppresseurs.

10 La présente invention offre pour la première fois la possibilité d'identifier, d'isoler et d'amplifier une population Ts pure. La présente invention découle en effet de la mise en évidence que la molécule CD90, encore appelée THY-1, représente un marqueur caractéristique des cellules Ts humaines et peut être utilisée efficacement pour identifier cette population cellulaire.

15 L'antigène THY-1 (Seki et al., 1985 ; Planelles et al., 1995) correspond à une glycoprotéine de surface bien caractérisée et ancrée à la membrane par un pont phosphatidyl-inositol. Cette protéine appartient à la superfamille des immunoglobulines et comprend environ 140 acides aminés (25-30 kDa). Cet antigène a été tout d'abord  
20 identifié comme un marqueur de différenciation exprimé dans le thymus et le cerveau de souris. Chez l'homme, THY-1 est exprimé sur un faible pourcentage de thymocytes fœtaux, sur les progéniteurs hématopoïétiques CD34+ immatures et sur moins de 1 % des lymphocytes CD3<sup>+</sup> présents dans la circulation périphérique. THY-1 est aussi exprimé sur les cellules mésenchymateuses, les cellules endothéliales ainsi que sur  
25 plusieurs lignées cellulaires continues. La fonction de THY-1 n'est pas connue.

Les inventeurs ont maintenant découvert que, de manière surprenante, l'expression de la molécule THY-1 est très étroitement corrélée à l'activité Ts, et que la molécule THY-1 constitue un marqueur spécifique permettant l'identification, la sélection, l'expansion ou la déplétion des lymphocytes T régulateurs in vitro ou in vivo.

30 Un premier aspect de l'invention concerne donc une méthode d'obtention, de préparation ou de production de lymphocytes T suppresseurs, comprenant une étape de



sélection, de séparation ou d'isolement (in vitro ou ex vivo) des lymphocytes T exprimant la molécule THY-1. Cette étape peut être réalisée à partir de tout échantillon biologique comprenant des lymphocytes.

5 Un objet plus particulier de la présente invention concerne une méthode d'obtention, de préparation ou de production de lymphocytes T suppresseurs comprenant :

(a) l'obtention d'une population de cellules de mammifère comprenant des lymphocytes T, et

(b) la récupération des lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1.

10

Les lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1 sont de préférence sélectionnés, séparés, isolés ou récupérés au moyen d'un ligand spécifique de THY-1. Avantagusement, le ligand est choisi parmi un anticorps ou un fragment d'anticorps. Le ligand peut être par exemple immobilisé sur un support ou placé en solution. Un tel

15 ligand est plus amplement défini dans la description qui suit de l'invention. En outre, l'étape (b) peut être précédée et/ou suivie d'une étape d'amplification des lymphocytes T et/ou d'une étape de purification de sous population(s) de lymphocytes, comme par exemple les lymphocytes CD4+ ou CD8+, voire de lymphocytes spécifiques d'un antigène donné.

20

Un autre objet de l'invention concerne une méthode d'identification et/ou de quantification de lymphocytes T suppresseurs dans une population cellulaire, comprenant l'exposition de ladite population cellulaire à un ligand spécifique de THY-1 et la détermination et/ou la quantification de la formation d'un complexe entre le ligand

25 et les cellules, la formation de tels complexes indiquant la présence et/ou la quantité de lymphocyte T suppresseurs au sein de la population cellulaire. Les cellules liant le ligand peuvent être séparées des cellules ne liant pas le ligand.

30

Un autre objet de l'invention réside dans une méthode de diagnostic d'un patient, comprenant la détermination de la présence, du nombre ou de l'état d'activité de cellules Ts chez ce patient en utilisant un ligand spécifique de Thy-1. Un tel diagnostic peut être réalisé in vitro, ex vivo ou in vivo, et permettre la détection d'un état pathologique lié à

l'activité du système immunitaire, ou le suivi de l'efficacité d'un traitement, ou la sélection d'un patient en vue de l'inclure dans un programme thérapeutique particulier.

Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un ligand spécifique de l'antigène Thy-1 pour sélectionner, identifier, trier ou préparer (in vitro ou ex vivo) des lymphocytes T suppresseurs.

Un autre objet de l'invention réside dans l'utilisation d'un ligand spécifique de l'antigène Thy-1 pour préparer une composition diagnostique destinée à sélectionner, identifier ou quantifier in vivo des lymphocytes T suppresseurs.

Un autre objet de l'invention concerne l'utilisation d'un ligand spécifique de l'antigène Thy-1 pour préparer une composition thérapeutique destinée à modifier, stimuler ou supprimer in vivo des lymphocytes T suppresseurs. A cet égard, un objet particulier de l'invention concerne l'utilisation d'un ligand spécifique de Thy-1 pour enrichir ou éliminer ex vivo ou in vivo les lymphocytes T suppresseurs d'une population cellulaire.

Un autre aspect de l'invention réside dans l'utilisation de l'antigène Thy-1 comme marqueur de sélection pour enrichir ou éliminer, in vivo, in vitro ou ex vivo, les lymphocytes Ts au sein d'une population cellulaire.

L'invention concerne en outre les lymphocytes T suppresseurs exprimant l'antigène THY-1 susceptibles d'être obtenus par une méthode telle que définie précédemment, ainsi qu'une population de cellules enrichie en cellules Ts, dans laquelle au moins 30%, de préférence au moins 50%, de manière encore plus préférée au moins 65% des cellules T expriment l'antigène THY-1. Des compositions ou populations cellulaires particulièrement préférées selon la présente invention comprennent au moins 75%, de préférence au moins 80% de cellules T exprimant Thy-1, plus préférentiellement au moins 85, 90 ou 95%.

30

L'invention concerne encore un lymphocyte T humain isolé, caractérisé en ce qu'il présente une activité suppressive et en ce qu'il exprime les marqueurs CD8 et THY-1,

ainsi qu'une population de cellules comprenant des cellules T suppressives CD8+THY-1+, de préférence une population comprenant au moins, 50, 60, 70, 80, 85, 90 ou 95% de cellules T CD8+THY-1+. De telles cellules peuvent, en partie exprimer également l'antigène CD25.

5

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, les lymphocytes T présents dans la population de cellules de mammifère ou les lymphocytes Ts (porteurs du marqueur THY-1) peuvent être modifiés génétiquement de manière à exprimer des produits biologiques d'intérêt, permettant notamment d'améliorer leur efficacité et/ou leur

10

sécurité d'utilisation.

L'invention concerne également une composition pharmaceutique comprenant des cellules ou populations cellulaires telles que définies précédemment, typiquement en association avec un véhicule ou excipient acceptable sur le plan pharmaceutique.

15

Un autre objet particulier de l'invention concerne une composition pharmaceutique comprenant des cellules T suppresseurs humaines amplifiées ex vivo et un adjuvant ou un milieu acceptable sur le plan pharmaceutique, lesdites cellules amplifiées étant enrichies en cellules exprimant l'antigène THY-1 et, éventuellement, en cellules

20

spécifiques d'un antigène particulier, tels que des allergènes, des auto-antigènes et des allo-antigènes. De manière préférée, l'antigène est impliqué dans ou spécifique d'une condition pathologique choisie parmi une maladie immunitaire, en particulier les maladies auto-immunes, la maladie du greffon contre l'hôte, une allergie et le rejet d'une greffe.

25

L'invention concerne également la préparation d'une composition constituée d'au moins un tel lymphocyte T suppresseur, d'une population enrichie en cellules Ts telle que définie ci-dessus ou au contraire d'une population déplétée en cellules Ts et d'un adjuvant ou d'un milieu acceptable sur le plan pharmaceutique ainsi que la composition

30

elle-même destinée à la mise en œuvre d'une méthode thérapeutique.

Un objet particulier de l'invention concerne ainsi également une méthode de production d'une composition pharmaceutique, comprenant :

- (a) l'obtention d'un échantillon biologique comprenant des lymphocytes T,
- (b) la sélection des lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1 au sein de cet échantillon biologique, et
- (c) le conditionnement desdits lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1 dans un adjuvant ou un milieu acceptable sur le plan pharmaceutique.

Un autre objet particulier de l'invention concerne ainsi également une méthode de production d'une composition pharmaceutique, comprenant :

- (a) l'obtention d'un échantillon biologique comprenant des lymphocytes T,
- (b) la déplétion des lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1 au sein de cet échantillon biologique, et
- (c) le conditionnement desdits lymphocytes T obtenus n'exprimant pas l'antigène THY-1 dans un adjuvant ou un milieu acceptable sur le plan pharmaceutique.

L'invention concerne par ailleurs un kit pour isoler ou caractériser des cellules Ts comprenant un ligand spécifique de THY-1, éventuellement disposé sur un support ou placé en solution ainsi que, éventuellement, des réactifs pour la détection du ligand. Le ligand est typiquement disposé dans un conteneur, tel qu'une plaque, seringue, tube, pipette, flacon, etc. Un tel kit peut en outre être utilisé pour diagnostiquer la présence de telles cellules Ts à partir d'un échantillon biologique prélevé sur un individu à tester ou directement in vivo.

L'invention concerne par ailleurs un kit ou une composition pour éliminer les cellules Ts in vivo, in vitro ou ex vivo, comprenant un ligand spécifique de THY-1, éventuellement placé en solution ou sur un support, et couplé à un produit toxique (radioactif, toxines...). L'invention vise également l'utilisation d'un ligand de Thy-1 pour cibler spécifiquement un vecteur viral ou non viral dans les Ts afin d'exprimer des gènes toxiques.

L'invention concerne par ailleurs un kit ou une composition pour activer les cellules Ts in vivo, ex vivo ou in vitro, comprenant un ligand spécifique de THY-1, éventuellement placé en solution ou sur un support, couplé à un produit capable d'activer les lymphocytes T (par exemple une cytokine, telle que IL2, IL7, IL15). L'invention vise également l'utilisation d'un ligand de thy-1 pour cibler spécifiquement un vecteur viral ou non viral dans les Ts afin d'exprimer des gènes activateurs ou tout gènes thérapeutiques.

Les cellules Ts, les compositions constituées de cellules Ts isolées ou amplifiées et les compositions enrichies en cellules Ts obtenues dans le cadre de la présente invention peuvent être avantageusement utilisées dans le cadre d'applications expérimentales ou thérapeutiques. Les cellules utilisées dans le cadre de la présente invention sont des cellules de mammifère, le mammifère préférentiellement concerné étant l'être humain.

Un objet particulier de l'invention a également trait à une méthode d'obtention de séquences génétiques spécifiquement exprimées dans des lymphocytes T suppresseurs, la méthode comprenant l'isolement de l'ARN d'une population de lymphocytes T exprimant l'antigène Thy-1, la comparaison dudit ARN à l'ARN extrait d'une population de lymphocytes T non suppresseurs et la récupération de l'ARN spécifique des lymphocytes T suppresseurs. L'invention concerne également une méthode telle que décrite précédemment comprenant en outre la fabrication d'une sonde à partir de l'ARN spécifique des lymphocytes T suppresseurs et le criblage d'une population d'acides nucléiques destinés à être hybridés à ladite sonde.

Un autre objet particulier de l'invention concerne en outre l'utilisation, dans un cadre thérapeutique, des cellules Ts, des compositions constituées de cellules Ts isolées ou amplifiées et des compositions enrichies en cellules Ts obtenues dans le cadre de la présente invention, par exemple pour traiter des patients humains souffrant de ou présentant un risque de développer une maladie immunitaire, en particulier une maladie provoquée par une réponse T anormale. Les cellules Ts sont ainsi adaptées au traitement de diverses pathologies ou affections provoquées par un désordre affectant les lymphocytes T et en particulier une tumeur, une maladie auto-immune, une allergie, la

maladie du greffon contre l'hôte, une maladie inflammatoire, un diabète de type I, une infection virale ou bactérienne, etc. Elles favorisent également la reconstitution immune et l'induction d'une tolérance en cas de greffe ou de transplantation de cellules souches, tissus ou organe chez un mammifère. C'est le cas, par exemple suite à une greffe de moelle osseuse ou de cellules souches hématopoïétiques. Le traitement peut être préventif ou curatif. Il peut également être combiné à d'autres traitements.

#### Cellules T suppresseurs (Ts) humaines

- 10 Dans le contexte de la présente invention, les cellules T suppresseurs désignent une population de cellules T qui sont caractérisées par leur capacité à supprimer ou diminuer les réactions immunitaires médiées par les cellules T effectrices, telles que les cellules T CD4+ ou CD8+.
- 15 Comme indiqué dans l'introduction de la présente demande, bien que les marqueurs CD4 et CD25 caractérisent les lymphocytes T suppresseurs sur un plan immunophénotypique, il apparaît en fait que les fonctions suppressives ne sont pas entièrement portées par les cellules CD4+/CD25+ et que toutes les cellules CD4+/CD25+ ne sont pas suppressives. CD25 est en effet un marqueur également
- 20 exprimé par les cellules T effectrices activées. La présente invention découle de la mise en évidence que la molécule THY-1 représente un marqueur caractéristique des cellules Ts humaines et peut être utilisée efficacement pour identifier cette population cellulaire.

La présente invention concerne ainsi, comme indiqué précédemment, une méthode d'obtention, de préparation, de sélection ou de production de lymphocytes T suppresseurs comprenant :

- (a) l'obtention d'une population de cellules de mammifère comprenant des lymphocytes T, et
- (b) la récupération des lymphocytes T exprimant THY-1.

30

La population cellulaire peut être obtenue, dans le cadre de l'étape (a), à partir d'échantillons biologiques comprenant des lymphocytes, notamment d'échantillons d'un

tissu choisi parmi la moelle osseuse, la rate, le foie, le thymus, du sang ayant ou non été préalablement enrichi en lymphocytes T, du sang de cordon ombilical, du sang périphérique fœtal, de nouveaux-nés ou d'adulte, du plasma, d'un nœud lymphatique, d'une tumeur, d'un site inflammatoire, d'un organe transplanté ou d'une culture de  
5 cellules établie avec l'un ou l'autre desdits tissus. Les lymphocytes sont typiquement isolés ou collectés à partir du sang périphérique.

Les lymphocytes T exprimant THY-1 peuvent être récupérés, sélectionnés, isolés ou triés, notamment lors de l'étape (b), à l'aide de tout ligand spécifique de THY-1, c'est-à-  
10 dire typiquement de toute molécule capable de lier sélectivement Thy-1 à la surface d'une cellule. Le ligand est de préférence choisi parmi un anticorps, de préférence un anticorps anti-THY-1, un analogue ou un fragment d'un tel anticorps.

THY-1 est une molécule dépourvue de domaine intra-cytoplasmique qui interagit avec la  
15 membrane cellulaire par l'intermédiaire d'un glycoposphatidylinositol (GPI) qui s'attache à la membrane par son extrémité C-terminale. La séquence de Thy-1 a été déterminée et est accessible dans la littérature, comme par exemple la séquence nucléotidique (n° NM 006288 (gi : 199 233 61)) et la séquence en acides aminés (n° NP 006279 (gi : 199 233 62)) de la protéine humaine. Un ligand spécifique selon l'invention  
20 est de préférence une molécule capable de lier sélectivement un polypeptide comprenant tout ou partie de la séquence de la protéine Thy-1 humaine, de préférence une molécule comprenant un épitope de la protéine Thy-1 humaine. De tels ligands sont naturellement choisis parmi les molécules reconnues et/ou capables d'interagir avec la partie extra-cellulaire de THY-1.

25

Un ligand préféré de THY-1, utilisable dans le cadre de la présente invention, est un anticorps anti-THY-1 (c'est-à-dire un anticorps spécifique de Thy-1). L'anticorps peut être polyclonal ou monoclonal. Il peut également s'agir d'un fragment ou dérivé d'anticorps présentant substantiellement la même spécificité antigénique, en particulier  
30 de fragments d'anticorps (e.g., Fab, Fab'2, CDRs), d'anticorps humanisés, d'anticorps humains, d'anticorps poly-fonctionnels, monocaténares (ScFv), ou multimériques (couplage C4bp par exemple), etc. Les anticorps, et donc les sites de reconnaissance de

la molécule THY-1 utilisables pour générer un ligand spécifique, peuvent être produits à l'aide de méthodes conventionnelles, comprenant l'immunisation d'un animal non-humain avec un polypeptide THY-1 ou un fragment de celui-ci comportant un épitope, et la récupération de son sérum (polyclonal) ou de cellules spléniques (de manière à  
5 produire des hybridomes par fusion avec des lignées cellulaires appropriées). Diverses méthodes de production d'anticorps polyclonaux à partir d'espèces variées ont été décrites dans l'art antérieur. Typiquement, l'antigène est combiné avec un adjuvant (par exemple l'adjuvant de Freund) et administré à un animal, par exemple par injection sous-cutanée. Des injections répétées peuvent être réalisées. Les échantillons sanguins  
10 sont collectés et l'immunoglobuline ou le sérum sont séparés.

Les méthodes classiques de production d'anticorps monoclonaux comprennent l'immunisation d'un animal non-humain avec un antigène, suivie de la récupération des cellules spléniques qui sont ensuite fusionnées avec des cellules immortalisées, telles  
15 que des cellules de myélome. Les hybridomes résultant produisent des anticorps monoclonaux et peuvent être sélectionnés par dilutions limites de manière à isoler les clones individuels. Les fragments Fab ou F(ab')<sub>2</sub> peuvent être produits par digestion à l'aide d'une protéase selon les techniques conventionnelles.

20 Les anticorps préférés sont des anticorps spécifiques de la protéine THY-1, notamment son domaine extracellulaire, c'est-à-dire ayant une affinité supérieure pour cette protéine que pour d'autres antigènes, même si une liaison non-spécifique ou moins affine ne peut être exclue. Le terme « spécifique » ou « sélectif » indique notamment que la liaison du ligand à la protéine Thy-1 peut être discriminée de la liaison éventuelle du ligand à  
25 d'autres molécules.

Des exemple particuliers de ligands spécifiques selon l'invention sont notamment les anticorps monoclonaux produits par les hybridomes K17 (ATCC n° HB-8553), les clones 5E10, F15-42-1 ou Thy-1/310, ainsi que tout fragment ou dérivé de ces anticorps.  
30

D'autres ligands spécifiques selon l'invention sont par exemple des ligands artificiels, présentant une affinité particulière pour Thy-1. De tels ligands peuvent être de nature



variée, comme des acides nucléiques (par exemple des aptamères) ou des molécules chimiques de synthèse. De telles molécules peuvent être générées par exemple sur la base des séquences des sites de reconnaissance de la molécule THY-1 par les anticorps spécifiques définis précédemment.

5

Les cellules Ts peuvent ainsi être isolées, dans le cadre de l'étape (b), par mise en contact de la population cellulaire avec un ou plusieurs ligands spécifiques, tels que ceux définis précédemment.

- 10 Le ligand peut être immobilisé sur un support, par exemple une colonne ou une bille (notamment une bille magnétique), ou placé en solution. En outre, ou en variante, le ligand peut éventuellement être marqué. Le marquage peut être réalisé à l'aide d'un marqueur de détection fluorescent, radioactif, luminescent, phosphorescent, chimique ou enzymatique. Le marqueur de détection est de préférence choisi parmi la fluorescéine, le
- 15 rouge Texas, la rhodamine, la phycoérythrine, la allophycocyanine, la biotine et la streptavidine, la Cyanine.

- Les complexes formés par le ligand et les cellules peuvent être utilisés pour visualiser, détecter, quantifier, trier et/ou isoler les cellules, selon des techniques variées et connues
- 20 en soi de l'homme du métier. Ainsi, les cellules peuvent être récupérées, sélectionnées, triées, séparées ou isolées par exemple par une méthode choisie parmi la cytométrie de flux, la chromatographie d'affinité, le FACS (« Fluorescent Activated Cell Sorting »), le MACS (« Magnetic bead Cell Sorting »), le D/MACS (« Double Magnetic bead Cell Sorting »), une méthode de sélection sur surface solide (« panning »), un test ELISA, un
- 25 test RIA, etc.

- La procédure MACS est décrite en détails par Miltenyi et al., "High Gradient Magnetic Cell Separation with MACS," Cytometry 11: 231-238 (1990). Afin de récupérer les cellules, les cellules marquées avec des billes magnétiques traversent une
- 30 colonne de séparation paramagnétique. La colonne de séparation est placée à proximité d'un aimant, créant ainsi un champ magnétique à l'intérieur de la colonne. Les cellules

marquées magnétiquement sont piégées dans la colonne, les autres traversent cette dernière. Les cellules piégées à l'intérieur de la colonne sont ensuite éluées.

5 Dans la procédure D/MACS, un échantillon de cellules est marqué à l'aide de billes magnétiques comprenant des anticorps, et les cellules sont récoltées ou triées par application d'un champs magnétique.

10 Selon un mode de réalisation préféré, les cellules ( par exemple du sang périphérique) sont incubées de façon séquentielle avec des quantités saturantes d'anticorps anti-THY-1 fonctionnalisés (e.g., marqué à la biotine) et avec un support solide (par exemple des microbilles) fonctionnalisés (e.g., recouvert de streptavidine). Les cellules sont ensuite purifiées par récupération du support, e.g., par séparation magnétique des cellules. De manière à augmenter la purification des cellules, les cellules de la fraction positive peuvent être ultérieurement séparées sur une autre colonne. La purification est  
15 généralement réalisée dans un tampon de sels phosphate, bien que d'autres milieux adaptés puissent être utilisés.

Les cellules peuvent être cultivées ou maintenues dans tout tampon ou milieu adapté, telle qu'une solution saline, un tampon, un milieu de culture, en particulier le DMEM, le  
20 RPMI etc. Elles peuvent être congelées ou maintenues dans une situation froide. Elles peuvent être formulées dans tout dispositif ou appareil approprié, tel qu'un tube, une flasque, une ampoule, un plat, une seringue, une poche, etc., de préférence dans des conditions stériles adaptées à une utilisation pharmaceutique.

25 Comme indiqué précédemment, l'étape (b) de la méthode décrite ci-dessus peut avantageusement être précédée et/ou suivie d'une étape de purification d'une sous population de lymphocytes T (CD4+ et/ou CD8+ par exemple) et/ou d'une étape d'amplification des lymphocytes (qui peut être réalisée ex vivo ou in vitro).

30 L'amplification peut être obtenue par activation des lymphocytes. Cette activation peut être non spécifique (obtenue par exemple par des anticorps anti-CD3 et/ou anti-CD28, avec ou sans IL2) ou spécifique (obtenue par des antigènes ou allo-antigènes présentés.

de façon adéquate au lymphocytes Ts, par exemple par des cellules présentatrices de l'antigène (cellules dendritiques, lymphocytes B, monocytes macrophages, cellules génétiquement modifiées capable de présenter l'antigène et d'activer les lymphocytes), des exosomes, des dexosomes, des structures artificielles, etc.). L'étape d'amplification permet d'augmenter le nombre de lymphocytes T présents au sein de la population lymphocytaire T de départ (qui comprend des lymphocytes T effecteurs et des lymphocytes T suppresseurs) avant de procéder à la sélection des lymphocytes Ts, et/ou d'augmenter le nombre de lymphocytes Ts après avoir sélectionné les lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1. Il est également possible de procéder à deux étapes d'amplification, l'une précédant et l'autre consécutivement à l'étape de sélection/récupération des lymphocyte Ts.

La population de l'étape (a) peut ainsi être enrichie en cellules T, éventuellement en une ou des sous-populations spécifiques de lymphocytes (par exemple CD4+ et/ou CD8+). Elle peut également être débarrassée de certaines sous-populations de lymphocytes, le cas échéant. La population de l'étape (a), éventuellement amplifiée et/ou triée, comprend ainsi de préférence au moins 30%, de préférence au moins 50%, de manière encore plus préférée au moins 65% de cellules T. Des compositions enrichies en cellules T particulièrement préférées susceptibles d'être utilisées dans le cadre de l'étape (b) comprennent au moins 75%, de préférence au moins 80% de cellules T.

La population de lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1 peut également être amplifiée. Il est par ailleurs possible, comme indiqué ci-dessus, de procéder à deux étapes d'amplification, l'une concernant la population lymphocytaire T générale, l'autre concernant la population de lymphocyte Ts.

Un objet particulier de la présente invention concerne ainsi une méthode d'obtention de lymphocytes T suppresseurs comprenant :

- (a) l'obtention d'une population de cellules de mammifère comprenant des lymphocytes T,
- (a') l'amplification des lymphocytes T au sein de ladite population de cellules, et

(b) la récupération des lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1.

Un autre objet particulier de la présente invention concerne une méthode d'obtention de lymphocytes T suppresseurs comprenant :

5 (a) l'obtention d'une population de cellules de mammifère comprenant des lymphocytes T,

(b) la récupération des lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1, et

(b') l'amplification desdits lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1.

10 L'amplification cellulaire des lymphocytes T (dans l'étape a' ou b') est de préférence réalisée par culture des cellules en présence d'une cytokine et éventuellement d'un agent de stimulation. Dans le cas des lymphocytes exprimant l'antigène THY-1 (lymphocytes Ts), la culture est maintenue pendant une période suffisante pour obtenir l'amplification de ladite population cellulaire, sans altérer le phénotype CD90+ au sein des populations  
15 lymphocytaires T CD4+ et/ou CD8+. L'activation implique généralement la culture en présence d'une cytokine, telle que par exemple, l'interleukine-2 (IL-2), l'interleukine-7 (IL-7) ou l'interleukine-15 (IL-15), de préférence d'origine humaine. L'agent de stimulation peut être une cellule présentatrice d'antigène (« CPA »), i.e., toute cellule présentatrice d'antigènes ou toute cellule favorisant l'activation des cellules T, en  
20 particulier des cellules Ts. Les CPA sont de préférence irradiées avant leur utilisation afin d'éviter leur amplification. Les CPA peuvent être des cellules isolées d'un donneur ou du patient lui-même. Elles peuvent être choisies pour produire des cellules Ts présentant un profil d'activité choisi. Des exemples caractéristiques de telles CPA incluent les cellules mononucléaires du sang périphérique, des cellules dendritiques, des  
25 splénocytes, des cellules du sang de cordon ombilical, des échantillons de tissu ou d'organe, etc. D'autres agents de stimulation des cellules Ts adaptés incluent les polymères MHC, les lectines (telles que PHA), les anticorps (tels que les anticorps anti-CD3 et/ou anti-CD28) ou des fragments de ces derniers, les auto-antigènes (incluant les tissus, cellules, fragments cellulaires ou débris, les polypeptides ou peptides purifiés,  
30 etc., de préférence en combinaison avec les CPA), etc.

Selon l'utilisation envisagée, les cellules Ts peuvent être amplifiées de différentes façons, qu'elles soient antigènes spécifiques ou non. En particulier, pour certaines utilisations, des quantités élevées du répertoire complet des cellules T sont, de préférence, utilisées (e.g., injectées). Cette technique est, en particulier, adaptée aux patients qui présentent un déficit global (quantitatif ou fonctionnel) en cellules Ts, tels que les patients souffrant d'un diabète de type I. Dans de telles indications, les cellules Ts sont de préférence amplifiées par exemple, à l'aide de cellules CPA autologues et PHA ou d'anticorps anti-CD3 et/ou anti-CD25 (ou de tout autre activateur de cellules T ou Ts) en présence de cytokines de nature identique ou différente.

Généralement, la spécificité des cellules Ts est importante à prendre en compte. En effet, bien qu'il soit possible d'utiliser des cellules Ts non-spécifiques pour contrôler des réponses immunes spécifiques, l'utilisation de Ts spécifiques apparaît plus efficace. Ainsi, les lymphocytes Ts, chez l'homme et chez la souris, peuvent être cultivés et amplifiés in vitro en présence d'un milieu de culture contenant de l'interleukine 2, des anticorps anti-CD3 et anti-CD28. Des lymphocytes Ts spécifiques peuvent être aussi isolés, générés par exemple par stimulation en présence de cellules présentatrices d'antigènes allogéniques, suivie d'une culture par interleukine 2. Selon un autre mode de réalisation, une amplification plus spécifique peut être envisagée, en particulier lorsqu'une suppression de cellules T effectrices spécifiques est souhaitée, comme dans le cadre des maladies auto-immunes, des allergies, des rejets de greffe, de la GVHD, etc. Dans de telles indications, les cellules sont de préférence amplifiées en présence de CPA présentant des antigènes particuliers, par exemple allogéniques, afin de favoriser l'amplification des cellules Ts préférentiellement actives à l'encontre de cellules T effectrices pathogènes.

Pour traiter les maladies auto-immunes, les cellules Ts proviennent de préférence du patient et sont stimulées à l'aide de CPA autologues et d'auto-antigènes provenant du tissu cible, en présence de cytokines. Les auto-antigènes peuvent être des tissus, cellules, fragments cellulaires, protéines purifiées, peptides, acides nucléiques, etc.

Pour le traitement des allogreffes ou xénogreffes, les cellules Ts proviennent de préférence du patient et sont stimulées par des CPA ou des tissus provenant du donneur, en présence de cytokines. Les cellules Ts provenant du patient peuvent aussi être stimulées par des CPA autologues en présence de tissus, cellules, fragments cellulaires, protéines purifiées ou peptides provenant du donneur et de cytokines.

Pour traiter les allergies, les cellules Ts proviennent typiquement du patient et sont stimulées par des CPA et des allergènes, en présence de cytokines.

Comme indiqué ci-dessus, les cytokines préférentiellement utilisées sont l'IL-2 et/ou l'IL-15.

Comme indiqué précédemment, les cellules Ts utilisées pour traiter diverses pathologies telles que le rejet d'un organe transplanté, des maladies auto-immune, les allergies, les pathologies induites par un virus, etc., sont de préférence autologues, i.e., elles proviennent du sujet à traiter. Les cellules syngéniques peuvent également être utilisées. Dans d'autres situations, par exemple dans le cadre du traitement de la GVHD ou d'autres pathologies, les cellules Ts sont typiquement allogéniques, i.e., elles proviennent d'un être humain différent. Dans ces cas, il est préférable d'utiliser des cellules Ts provenant d'un sujet donneur (e.g., le sujet donneur des cellules effectrices).

#### Modification génétique des cellules T et notamment des cellule Ts

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, les lymphocytes T (population générale des lymphocytes T) présents dans la population de cellules de mammifère ou les lymphocytes Ts (porteurs du marqueur THY-1) peuvent être modifiés génétiquement de manière à exprimer des produits biologiques d'intérêt.

L'expression « génétiquement modifiées » indique que les cellules comprennent une molécule d'acide nucléique qui n'est pas naturellement présente dans les cellules Ts non modifiées, ou qui est présente dans ces cellules lorsqu'elles ne sont pas dans leur état

naturel (e.g., lorsqu'elles sont amplifiées). La molécule d'acide nucléique peut avoir été introduite dans lesdites cellules ou dans une cellule parente ou progénitrice.

Un objet particulier de l'invention concerne ainsi une méthode d'obtention ou de production de lymphocytes T suppresseurs comprenant :

- 5 (a) l'obtention d'une population de cellules de mammifère comprenant des lymphocytes T,
- (b) la récupération des lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1, et
- (c) la modification génétique desdits lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1
- 10 par mise en contact desdits lymphocytes avec une molécule d'acide nucléique recombinant.

Un autre objet particulier de l'invention concerne une méthode d'obtention ou de production de lymphocytes T suppresseurs comprenant :

- 15 (a) l'obtention d'une population de cellules de mammifère comprenant des lymphocytes T,
- (b) la modification génétique desdits lymphocytes T par mise en contact de ladite population de cellules avec une molécule d'acide nucléique recombinant, et
- (c) la récupération des lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1.

20

Plusieurs approches peuvent être utilisées pour modifier sur le plan génétique les cellules T appartenant à la population de cellules de mammifère [assimilable à la population générale des lymphocytes T (cellules T effectrices et cellules Ts)] ou les lymphocytes Ts, telles que, par exemple, la délivrance de gène par l'intermédiaire d'un virus, l'ADN

25 nu, des traitements physiques, etc. A cette fin, l'acide nucléique est généralement incorporé dans un vecteur, tel qu'un virus recombinant, un plasmide, un phage, un épisome, un chromosome artificiel, etc.

Selon un mode de réalisation particulier de l'invention, les cellules T telles que définies

30 au paragraphe précédant, sont modifiées génétiquement à l'aide d'un vecteur viral (ou d'un virus recombinant). L'acide nucléique hétérologue est, par exemple, introduit dans un virus recombinant qui est ensuite utilisé pour infecter des lymphocytes T. Différents

types de virus recombinants peuvent être utilisés, en particulier des rétrovirus recombinants ou des AAV. Les lymphocytes T sont de préférence modifiés à l'aide d'un rétrovirus recombinant. L'utilisation de rétrovirus est particulièrement appréciée dans la mesure où l'infection rétrovirale permet une intégration stable de l'acide nucléique dans le génome des cellules. Cette propriété est particulièrement importante, dans la mesure où l'amplification des lymphocytes, qu'elle soit réalisée in vitro ou in vivo après l'injection chez le sujet, requiert que le transgène soit maintenu stable durant la division cellulaire. Des exemples de rétrovirus susceptibles d'être utilisés proviennent de la famille des oncovirus, des lentivirus ou des spumavirus. Des exemples particuliers de la famille des oncovirus sont MoMLV, ALV, BLV ou MMTV mais également RSV, etc. Des exemples de la famille des lentivirus sont HIV, SIV, FIV ou CAEV, etc.

Des techniques permettant de construire des rétrovirus recombinants ont été largement décrites dans la littérature (WO 89/07150, WO 90/02806 et WO 94/19478, dont les enseignements sont intégralement incorporés dans la présente demande). Ces techniques comprennent généralement l'introduction d'un vecteur rétroviral comprenant le transgène dans une lignée de cellules d'empaquetage appropriée, suivie de la récupération des virus produits, lesdits virus comprenant le transgène dans leur génome.

Dans un mode de réalisation particulier de l'invention, le rétrovirus recombinant comprend l'enveloppe du virus GALV (rétrovirus pseudotypé avec GALV). Il a été démontré que l'infection des cellules hématopoïétiques par un rétrovirus recombinant est plus efficace lorsque l'enveloppe du rétrovirus provient du rétrovirus GALV (Gibbon Ape Leukemia Virus). En utilisant cette enveloppe rétrovirale, un taux de transduction de plus de 95% des lymphocytes a pu être obtenu avant la sélection des cellules transduites.

Les lymphocytes T peuvent être infectés à l'aide de virus recombinants et au moyen de divers protocoles, tels que l'incubation avec un surnageant de virus, avec des virus purifiés, par coculture de lymphocytes T avec les cellules virales d'empaquetage, par des techniques Transwell, etc. Une méthode particulièrement efficace comprenant une étape de centrifugation a été décrite par Movassagh et al. (Movassagh M, Desmyter C, Baillou C, Chapel-Fernandes S, Guigon M, Klatzmann D, Lemoine FM. High-level gene transfer to cord blood progenitors using gibbon ape leukemia virus pseudotype retroviral



vectors and an improved clinically applicable protocol. *Hum Gene Ther.* 1998;9:225-234).

Les techniques non virales incluent l'utilisation de lipides cationiques, de polymères, de peptides, d'agents synthétiques, etc. Des méthodes alternatives utilisent la technique du « gene gun », les champs électriques, le bombardement, la précipitation, etc. En réalisant la présente invention, il n'est pas nécessaire, que toutes les cellules Ts soient modifiées génétiquement. Il est ainsi possible d'utiliser une population de lymphocytes T comprenant au moins 50%, de préférence au moins 65%, encore plus préférentiellement au moins 80% de lymphocytes modifiés génétiquement. Des niveaux plus élevés (e.g., jusqu'à 100%) peuvent être obtenus in vitro ou ex vivo ; par exemple en utilisant l'enveloppe GALV et/ou des conditions d'infection particulières (Movassagh et al.) et/ou en sélectionnant les cellules qui ont effectivement été modifiées génétiquement. Différentes techniques de sélection peuvent être utilisées, incluant l'utilisation d'anticorps reconnaissant des marqueurs spécifiques présents à la surface des cellules modifiées, l'utilisation de gènes de résistance (tel que le gène de résistance à la néomycine et la molécule G418), ou l'utilisation de composés toxiques pour les cellules n'exprimant pas le transgène (i.e., la thymidine kinase). La sélection est de préférence réalisée à l'aide d'un gène marqueur exprimant une protéine membranaire. La présence de cette protéine permet la sélection à l'aide de techniques conventionnelles de séparation telles que la séparation à l'aide de billes magnétiques, l'utilisation de colonnes ou la cytométrie de flux.

L'acide nucléique utilisé pour modifier les cellules T sur le plan génétique peut être un transgène thérapeutique et peut coder pour des produits biologiques actifs variés, incluant des polypeptides (e.g., protéines, peptides, etc.), des ARNs, etc. Dans un mode de réalisation préféré, l'acide nucléique code pour un polypeptide présentant une activité immunosuppressive. Dans un autre mode de réalisation, l'acide nucléique code pour un polypeptide toxique ou présentant une toxicité conditionnelle pour les cellules. Des exemples préférés incluent la thymidine kinase (qui confère la toxicité en présence d'analogues de nucléoside), telles que HSV-1 TK, une cytosine déaminase, gp<sub>r</sub>t, etc. Il peut aussi s'agir d'un polypeptide non toxique mais pouvant permettre l'élimination des

cellules injectées en cas de besoin (comme par exemple une molécule exprimée à la membrane cellulaire et un anticorps monoclonal fixant le complément). Une autre catégorie préférée d'acides nucléiques sont ceux codant pour un récepteur de cellule T ou une sous-unité ou un équivalent fonctionnel de celui-ci. L'expression au sein des  
5 cellules Ts d'un TCR recombinant spécifique d'un auto-antigène produit des cellules Ts qui peuvent agir plus spécifiquement sur des cellules T effectrices qui détruisent un tissu chez un sujet. D'autres types de molécules actives sur le plan biologique incluent des facteurs de croissance, des lymphokines (comprenant diverses cytokines qui activent les cellules Ts), des cytokines immunosuppressives (telles que IL-10 ou TGF- $\beta$ ), des  
10 molécules accessoires, des molécules présentatrices d'antigènes, des récepteurs d'antigènes, etc. L'acide nucléique peut coder pour des « T-bodies », i.e., des récepteurs hybrides entre des récepteurs de cellule T et une immunoglobuline. De tels « T-bodies » permettent le ciblage de complexes antigéniques, par exemple.

15 De manière préférée, les lymphocytes T suppresseurs sont génétiquement modifiés et comprennent un acide nucléique recombinant codant pour un produit présentant une toxicité conditionnelle pour ces cellules, tel que la thymidine kinase. Selon un autre mode de réalisation préféré de l'invention, les cellules Ts génétiquement modifiées comprennent une molécule d'acide nucléique recombinant codant pour un récepteur de  
20 cellule T ou pour une sous-unité ou pour un équivalent fonctionnel de celui-ci.

Dans certaines indications, comme notamment la greffe de moelle osseuse allogénique, on peut être amené à réaliser des préparations séparées de lymphocytes Ts et T effecteurs, chacun exprimant un gène différent codant un produit présentant une toxicité conditionnelle, et permettant ainsi d'éliminer si nécessaire l'une ou l'autre des  
25 populations cellulaires.

L'acide nucléique qui est introduit dans les cellules T selon l'invention comprend typiquement, en plus de la région codante, des séquences de régulation, telle qu'un promoteur et une séquence de polyadénylation.

Compositions

Un objet particulier de cette invention est une composition constituée d'au moins un lymphocyte T suppresseur selon l'invention, e.g. isolé, génétiquement modifié et/ou amplifié ex vivo, d'une population enrichie en cellules Ts telle que définie précédemment ou au contraire d'une population déplétée en cellules Ts, ainsi qu'un adjuvant ou un milieu acceptable sur le plan pharmaceutique.

Un autre objet particulier de l'invention est une composition comprenant des lymphocytes Ts transduits à l'aide premier d'un gène suicide et des cellules T effectrices transduites à l'aide d'un second gène suicide, différent du premier.

Les compositions peuvent comprendre d'autres types cellulaires, sans affecter de façon significative le bénéfice thérapeutique desdites compositions.

Selon un mode de réalisation préféré, les cellules sont conditionnées dans une composition comprenant entre environ  $10^5$  et  $10^{10}$  cellules Ts selon la pathologie à traiter, plus généralement entre  $10^5$  et environ  $10^9$  cellules Ts.

Des administrations répétées de telles compositions peuvent être mises en œuvre.

D'autres compositions particulières selon l'invention comprennent un ligand spécifique de Thy-1 couplé ou conjugué à une molécule effectrice, par exemple une molécule présentant une toxicité (conditionnelle ou non, par exemple une TK, toxine de ricin, etc.) ou une activité stimulante pour les lymphocytes T (par exemple une cytokine, notamment IL-2, IL-7, IL-15, etc.). De telles compositions peuvent être utilisées in vivo (ou ex vivo) pour moduler le répertoire ou l'activité des cellules Ts chez un sujet. Ainsi, l'administration d'un conjugué comprenant une molécule toxique peut permettre d'inactiver ou de réduire l'activité de cellules Ts chez un sujet, et donc d'augmenter l'activité de cellules effectrices. Inversement, l'administration d'un conjugué comprenant une molécule activatrice peut permettre de stimuler l'activité de cellules Ts

chez un sujet, et donc de réduire l'activité de cellules effectrices. Le couplage peut être covalent ou non.

5 D'autres compositions particulières de l'invention comprennent un agent de transfection couplé à un ligand spécifique de Thy-1. Un tel couplage permet de cibler ou de favoriser l'interaction entre l'agent de transfection et les cellules Ts. L'agent de transfection peut être une particule virale (par exemple recombinante, défective, atténuée, synthétique, etc.) ou un agent de transfection non-viral, tel qu'un liposome, un lipide cationique, un polymère, etc. Le couplage peut être covalent ou non.

10

### Utilisations

La présente invention permet d'obtenir des populations cellulaires utilisables pour le traitement de pathologies variées, associées à un dérèglement de l'activité des cellules T, 15 comme indiqué ci-dessus. Le traitement peut être préventif ou curatif. De plus, les cellules Ts, les populations cellulaires enrichies en cellules Ts et les compositions selon l'invention peuvent être utilisées en combinaison avec d'autres agents ou principes actifs, tels que d'autres populations cellulaires, des molécules ou des conditions immunosuppressives, des irradiations, des produits de thérapie génique, etc.

20

Le terme traitement signifie la diminution des symptômes ou des causes d'une maladie, la régression d'une maladie, le retardement d'une maladie, l'amélioration de l'état de patients, la réduction de leur souffrance, l'augmentation de leur durée de vie, etc.

25 Les cellules Ts, les populations cellulaires enrichies en cellules Ts et les compositions selon l'invention sont particulièrement adaptées pour retarder ou prévenir la maladie du greffon contre l'hôte (GVHD) chez les sujets ayant subi une transplantation d'organe allogénique, en particulier de moelle osseuse (ou de cellules souches hématopoïétiques ou de cellules souches non hématopoïétiques). La GVHD et les fréquentes complications 30 provoquées par la transplantation de cellules souches hématopoïétiques sont dues à la présence de cellules T donneuses matures dans le transplant. Cependant, l'élimination de ces cellules avant la greffe conduit à un échec de cette dernière, prolonge

l'immunosuppression et la réapparition d'une leucémie. L'administration de cellules Ts selon l'invention au moment de la greffe retarde ou même prévient la GVHD.

5 Les cellules Ts, les populations cellulaires enrichies en cellules Ts et les compositions selon l'invention sont également adaptées au traitement des maladies auto-immunes (incluant les maladies inflammatoires chroniques), telles que le lupus systémique érythémateux, l'arthrite rhumatoïde, la polymyosite, la sclérose multiple, le diabète, etc. Les maladies auto-immunes ont une composante immunologique comme de nombreuses investigations biologiques et histologiques ont pu le démontrer. Pour ces maladies,  
10 l'élément central, est une réponse immunitaire inadaptée. De plus, il est souvent possible d'identifier l'auto-antigène dans le cadre de ces maladies et de définir la période durant laquelle les cellules T délétères sont activées. La présente invention peut être utilisée pour prévenir, traiter, réduire ou atténuer de telles pathologies en administrant au sujet une quantité efficace de cellules Ts pour supprimer ou réduire l'activité de ces cellules T  
15 délétères. Des administrations répétées peuvent être réalisées si besoin.

Les cellules Ts, les populations cellulaires enrichies en cellules Ts et les compositions selon l'invention peuvent également être utilisées dans le cadre du traitement des maladies infectieuses et notamment des pathologies immunitaires induites par des virus.  
20 La réponse immune dirigée contre les agents infectieux peut avoir des conséquences immunopathologiques qui peuvent conduire à la mort. L'exemple le plus fréquent est la réponse à certains virus responsables de l'hépatite. Ces virus se répliquent dans les hépatocytes et la destruction de ces hépatocytes infectés par le système immunitaire provoque une hépatite, qui est parfois mortelle. L'évolution de cette hépatite chronique  
25 est accompagnée de signes biologiques et d'une réponse immunitaire anormale (par exemple, la présence d'anticorps anti-ADN ou d'une cryoglobulinémie). Les cellules Ts, les populations cellulaires enrichies en cellules Ts et les compositions selon l'invention permettent d'éliminer, supprimer ou réduire les lymphocytes T actifs responsables de la pathologie et ainsi de réduire les conséquences des pathologies immunitaires induites par  
30 des virus.

Les cellules Ts, les populations cellulaires enrichies en cellules Ts et les compositions selon l'invention peuvent également être utilisées pour le traitement ou la prévention du rejet d'organes transplantés tels que le cœur, le foie, les reins, les poumons, le pancréas, etc. Le traitement habituel d'un certain nombre de désordres affectant les organes  
5 consiste, lorsque cela devient nécessaire, en un remplacement de l'organe par un organe sain provenant d'un donneur décédé (ou d'un donneur vivant dans certains cas, ou même d'un donneur d'une autre espèce). C'est également le cas pour le traitement des diabètes insulino-dépendants, à travers la greffe de cellules ou d'un organe producteur d'insuline, tels que le pancréas ou les îlots pancréatiques. Même si un grand soin est pris dans la  
10 sélection de donneurs d'organes présentant un maximum de compatibilité vis-à-vis des antigènes d'histocompatibilité, l'organe transplanté conduit toujours, à l'exception des transplants réalisés entre jumeaux homozygotes, au développement d'une réponse immune dirigée contre les antigènes spécifiquement exprimés par cet organe. En dépit des traitements immunosuppresseurs menés, cette réaction aboutit souvent au rejet de  
15 l'organe transplanté (il s'agit de la principale cause d'échec des transplants allogéniques). A l'exception de certains rejet super-aigus ou aigus qui impliquent essentiellement des réponses humorales le rejet de l'organe transplanté est, dans la majorité des cas, essentiellement médié par les lymphocytes T effecteurs.

La présente invention permet désormais d'envisager un traitement (e.g. la diminution ou  
20 le retardement) du rejet d'organe à l'aide de cellules Ts. De telles cellules peuvent être préparées à partir de cellules du patient, stimulées avec les antigènes du donneur et ré-administrées au patient, avant ou pendant la transplantation d'organe. Des administrations répétées peuvent être réalisées si besoin. Cette approche est particulièrement adaptée au traitement des diabètes, i.e., pour réduire, retarder ou  
25 prévenir le rejet de cellules productrices d'insuline, de tissus ou d'organes (en particulier les îlots pancréatiques) transplantés. Typiquement, les cellules Ts sont amplifiées et activées par culture en présence d'auto-antigènes provenant du tissu donneur. Ces cellules peuvent être produites par exemple par culture en présence de cellules dendritiques autologues par rapport à la greffe. Ces cellules Ts amplifiées et activées  
30 peuvent être injectées au patient avant, pendant et/ou après la transplantation d'organe, réduisant ainsi l'activité destructrice des cellules T effectrices.

Les cellules Ts, les populations cellulaires enrichies en cellules Ts et les compositions selon l'invention sont également adaptées au traitement des allergies, qui sont médiées par des réponses immunes dirigées contre des antigènes particuliers appelés allergènes. En administrant au patients les cellules Ts activées ex vivo avec de tels allergènes, il est possible de réduire ces réponses immunitaires délétères.

Un autre objet de l'invention concerne une méthode de diminuer l'activité de lymphocytes T effecteurs chez un mammifère hôte, ladite méthode comprenant l'administration au mammifère de lymphocytes T suppresseurs selon l'invention compatibles avec ledit mammifère hôte, de préférence autologues.

La diminution des lymphocytes T suppresseurs peut également être recherchée (par exemple dans le cadre du traitement d'un cancer). Plusieurs modalités de traitement peuvent être utilisées.

Une première approche consiste à préparer ex vivo des cellules ayant une activité (par exemple anti-cancéreuse), déplétées en cellules Ts. Une telle déplétion peut être réalisée ex vivo conformément à une méthode selon l'invention telle que décrite précédemment. Le traitement consiste alors en la ré-administration au patient d'une population de lymphocytes T ou d'une composition comprenant une telle population dépourvue de cellules Ts, et ayant ou non été activé ex vivo. Ce traitement peut être accompagné d'une ou plusieurs vaccinations (par exemple anti-tumorales), combinées ou non à de la chimiothérapie, chez un patient ayant éventuellement reçu un conditionnement. Ce conditionnement peut notamment comprendre des traitements destinés à éliminer des lymphocytes T en division, et qui comprennent les lymphocytes T suppresseurs responsable de l'absence de réponse immunitaire efficace (comme par exemple les Ts qui empêchent le développement d'une réponse anti-tumorale efficace).

Une autre modalité consiste à dépler les T suppresseurs in vivo par l'utilisation se ligand et de tout activité ou molécule toxique adéquate (comme par exemple radioactivité ou toxine).

Les lymphocytes Ts peuvent aussi être activés in vivo, par exemple par des ligands de thy-1 couplé a des molécules d'activation des lymphocytes (IL2 par exemple). Le

traitement peut alors être administré par voie générale (intra-veineuse par exemple) ou sur le site où l'action est recherchée (dans le liquide synovial lors du traitement de la Polyarthrite rhumatoïde par exemple).

- 5 Un objet particulier de la présente demande correspond à l'utilisation, dans le cadre de la vaccination, d'une cellule Ts, d'une population cellulaire enrichie en cellules Ts ou d'une composition selon l'invention.

- 10 Des voies d'administrations et des protocoles variés peuvent être mis en œuvre dans le cadre de la présente invention. Ils peuvent être adaptés par l'homme du métier en fonction de la pathologie à traiter. Généralement, des administrations systémiques ou locales peuvent être envisagées et empruntent la voie intraveineuse, intra-artérielle, intra-péritonéal, intra-musculaire ou sous-cutanée, etc. Les cellules peuvent être injectées durant l'opération chirurgicale ou par tout moyen approprié, à l'aide par  
15 exemple, d'une seringue. Pour contrôler des maladies telles que la GVHD, les effets greffe contre infection (GVI) ou greffe contre leucémie (GVL) ou encore le rejet d'un organe transplanté, la composition cellulaire peut être administrée avant, pendant ou après la transplantation de la moelle osseuse (ou de l'organe). De plus, des administrations additionnelles peuvent être réalisées après la transplantation, de façon à  
20 prévenir ou retarder la pathologie.

Il est entendu que la présente invention n'est pas limitée aux modes spécifiques de réalisation décrits ci-après, mais s'étend également aux variantes d'exécution entrant dans les connaissances normales de l'homme du métier.

25

### LEGENDES DES FIGURES

- Figure 1 : Mise en évidence de l'expression de CD90 par les lymphocytes T  
30 CD4+/CD25+ et les lymphocytes CD8+/CD25+  
Figure 2 : Activité suppressive des populations CD4+/CD90+ et CD4+/CD25+  
Figure 3 : Expression des marqueurs CD25 et CD90 sur les lymphocytes T CD4+ et CD8+.



Figure 4 : Activité suppressive des populations CD4+/CD90+ et CD8+/CD90+

### EXEMPLES

5    **1. Le marqueur CD90 est exprimé par les lymphocytes T CD4+/CD25+ et les lymphocytes CD8+/CD25+**

10    Afin d'étudier l'expression du marqueur CD90 comparativement à CD25 sur les populations lymphocytaires T CD4+ et CD8+, des cellules mononucléées du sang périphérique adulte ont été obtenues par gradient de Ficoll puis marquées avec les anticorps suivants directement à des fluorochromes : anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25 et anti-CD90. Pour l'analyse immunophénotypique, les cellules ont été analysées par cytométrie en flux (FACScalibur), les événements étant ré-analysés sur les logiciels Cellquest et FlowJo.

15

La figure 1 A montre l'expression des marqueurs CD25 et CD90 sur les lymphocytes T CD4+ ainsi que la co-expression de CD25 au sein des populations CD4+/CD90- et CD4+ /CD90+. Comme on peut le voir, 9,7% et 1,8% des lymphocytes T CD4+ expriment, respectivement, les marqueurs CD25 et CD90. De plus, 92% des cellules  
20    CD4+/CD90+ sont CD25+ tandis qu'environ 36% des cellules CD4+/CD90- sont CD25+. L'expression de CD25 au sein des cellules CD4+/CD90+ est plus forte en intensité de fluorescence que dans la population CD4+/CD90-.

La figure 1 B montre l'expression des marqueurs CD25 et CD90 sur les lymphocytes T  
25    CD8+ ainsi que la co-expression de CD25 au sein des populations CD8+/CD90- et CD8+/CD90+. Comme on peut le voir, 9,5% et 0,8% des lymphocytes T CD8+ expriment, respectivement, les marqueurs CD25 et CD90. De plus, 96% des cellules CD8+/CD90+ sont CD25+ tandis qu'environ 28% des cellules CD8+/CD90- sont CD25+. L'expression de CD25 au sein des cellules CD8+/CD90+ est plus forte en  
30    intensité de fluorescence que dans la population CD8+/CD90-.

## 2. Les lymphocytes CD4+/90+ inhibent la prolifération de lymphocytes T autologues stimulés par anticorps OKT3/CD28.

Afin de montrer que les cellules CD4+/CD90+ ont une fonction suppressive, des lymphocytes T autologues CD4+ déplétés en cellules CD4+/CD25+ (CD25-) ont été stimulés par un mélange d'anticorps OKT3/CD28 préalablement immobilisé sur le fond des puits de culture. Les cellules CD25- ont été cultivées seules ou en présence d'un nombre égal de cellules CD4+/CD90+ ou CD4+/CD25+ (contrôle positif) pendant 4 jours puis la prolifération a été mesurée par test d'incorporation de thymidine tritiée, la lecture étant faite sur compteur  $\beta$ . Les résultats sont exprimés en cpm. Le pourcentage d'inhibition est calculée selon la formule suivant :  $\% \text{inhibition} = \frac{\text{Nbre cpm (1 - Nbre cpm (CD25- + Ts))}}{\text{Nbre cpm (CD25-)}} \times 100$ .

La figure 2 montre les pourcentages d'inhibition qu'exercent les populations CD4+/CD90+ et CD4+/CD25+ sur la prolifération de lymphocytes T autologues CD25-. Les résultats obtenus montrent que les cellules CD4+/CD90+ inhibent de plus de 75% la prolifération des cellules CD25-, révélant ainsi leur fonction suppressive.

## 3. Les lymphocytes CD4+/90+ et CD8+CD90+expriment Foxp3, CTLA4 et TGF $\beta$

L'analyse de l'expression des gènes Foxp3, CTLA4, CD4, CD25, TGF $\beta$  a été réalisé par PCR nestée après transcription inverse de l'ARN extrait de 1000 ou 5000 cellules issues des différentes populations lymphocytaires étudiées. Les résultats obtenus montrent que les lymphocytes CD4+/90+ et CD8+CD90+expriment Foxp3, CTLA4 et TGF $\beta$ .

## 4. CD90 permet d'identifier les lymphocytes CD4+/CD90+ et CD8+/CD90+ suppresseurs après culture.

Afin d'étudier si le marqueur CD90 permet, après activation et culture de lymphocytes T, d'identifier les lymphocytes T suppresseurs contrairement au marqueur CD25 également exprimés par les lymphocytes T activés, nous avons cultivé, en milieu liquide

RPMI 1640 en présence 10% de sérum humain AB et 5microgr d'anticorps OKT3, des lymphocytes T totaux dont les populations CD4+/CD90+, CD8+/CD90+ et CD4+/CD25+ ont été purifiées par cytométrie en flux après 6 jours de culture. Après culture, les différents types de cellules ont été analysés par cytométrie et testés pour leurs fonctions suppressives.

La figure 3 montre l'expression des marqueurs CD25 et CD90 sur les lymphocytes T CD4+ et CD8+ après 6 jours de culture. Comme on peut le voir, 6,4 % et 7,3 % des lymphocytes T CD4+ et CD8+ expriment respectivement le marqueur CD90, tandis que 61,6 % et 88,1 % des lymphocytes T CD4+ et CD8+ expriment le marqueur CD25.

La figure 4 montre l'inhibition qu'exercent les populations CD4+/CD90+ et CD8+/CD90+ sur la prolifération de lymphocytes T autologues CD25- tandis que les lymphocytes CD4+/CD25+ n'ont plus aucun effet supprimeur sur les cellules CD25- après culture. Ces résultats montrent que le marqueur CD90 reste un marqueur spécifique, contrairement au marqueur CD25, des populations suppressives au sein des lymphocytes T CD4+ et CD8+ cultivés.

## 5. Identification et suivi diagnostique

20

Nous avons montré que les patients présentant des complications auto-immunes d'une hépatite C présentent un déficit en lymphocytes CD4+CD25+ (Boyer et al. Blood, in press). D'autres auteurs ont montré un tel déficit pour le diabète de type I. Le diagnostic de ces pathologies et le suivi biologique et clinique sera plus spécifique en suivant les Ts par un marquage CD90. Ce suivi sera d'autant plus important pour les maladies évoluant par poussées, comme la polyarthrite rhumatoïde ou la SEP par exemple. Le choix et la date de l'intervention thérapeutique, qui pourra notamment être une injection de Ts, sera défini grâce au suivi des Ts par le marqueur CD90. L'identification des Ts est réalisée dans tout liquide biologique d'intérêt (sang, LCR, liquide synovial par exemple) ou dans tout tissu ou organe d'intérêt (tumeur, organe transplanté, etc.).

30

## **6. Injection Thérapeutique de Ts pour le contrôle de la GVH.**

Nous avons montré que les Ts jouent un rôle important dans le contrôle de la GVH et qu'il est possible de préparer des Ts spécifiques par allo-activation (Cohen et al. JEM 2003, Trénado et al., JCI 2003). Pour ces applications les Ts peuvent être obtenues à partir du sang, du sang de cordon, de la moelle osseuse de tous tissus contenant des lymphocytes T. Dans ces applications, elles peuvent être ou non modifiées génétiquement.

## **7. Injection Thérapeutique de Ts pour le contrôle de la SEP.**

Les Ts sont obtenues du patient ou d'un donneur compatible, de préférence géno-identique. Elle sont purifiées par billes immunomagnétiques, cytométrie en flux, par adhérence sur support solide recouvert d'anticorps spécifiques (panning) et éventuellement congelées. Le patient est l'objet d'un suivi biologique pour évaluer son nombre de cellules Ts. L'apparition de signes cliniques indiquant le début d'une poussée ou d'une chute du nombre de Ts conduit à l'injection des Ts qui sont soit préparées à cette occasion, soit celles préparées précédemment.

## **8. Ablation des Ts pour le traitement de tumeurs**

Nous avons montré que les Ts empêchent le développement de réactions immunitaires anti-tumorales efficaces. La déplétion de ces cellules permet à ces réponses de se développer. De plus, la préparation de lymphocytes T anti-tumoraux ex vivo se heurte au problème de leur contamination par les Ts.

Le principe du traitement est donc d'éliminer les Ts in vivo, notamment à l'aide d'un ligand de CD90 couplé à un toxique. Il peut également s'agir de dépléter l'ensemble des lymphocytes T par des traitements classiques (sérum anti-lymphocytaires, anti-CD3, anticorps Campath, irradiation, etc., par exemple). Ce traitement peut être complété par une administration de lymphocytes activés ex vivo contre les antigènes tumoraux après avoir été déplétés en Ts.

## REVENDICATIONS

- 5 1. Méthode d'obtention, de préparation ou de production de lymphocytes T suppresseurs, comprenant une étape de sélection, de séparation ou d'isolement in vitro ou ex vivo des lymphocytes T exprimant la molécule THY-1.
- 10 2. Méthode selon la revendication 1, comprenant :
  - (a) l'obtention d'une population de cellules de mammifère comprenant des lymphocytes T, et
  - (b) la récupération des lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1.
- 15 3. Méthode selon la revendication 1, caractérisée en ce que l'étape (b) est précédée ou suivie d'une étape d'amplification des lymphocytes T.
4. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que les lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1 sont sélectionnés, séparés, isolés ou récupérés au moyen d'un ligand spécifique de THY-1.
- 20 5. Méthode selon la revendication 4, caractérisée en ce que le ligand spécifique est un anticorps spécifique de Thy-1 ou un fragment ou dérivé d'un tel anticorps ayant substantiellement la même spécificité antigénique.
- 25 6. Méthode selon la revendication 5, caractérisée en ce que le ligand spécifique est un anticorps monoclonal ou polyclonal spécifique de Thy-1.
7. Méthode selon la revendication 5, caractérisée en ce que le ligand spécifique est un anticorps polyfonctionnel, monocaténaire ou multimérique, spécifique de Thy-1.
- 30 8. Méthode selon la revendication 4, caractérisée en ce que le ligand spécifique est un aptamère.

9. Méthode selon l'une des revendications 4 à 8, caractérisée en ce que le ligand est immobilisé sur un support ou placé en solution.
- 5 10. Méthode selon la revendication 9, caractérisée en ce que le support est une colonne ou une bille, de préférence une bille magnétique.
11. Méthode selon l'une des revendications 4 à 10, caractérisée en ce que le ligand est marqué.
- 10 12. Méthode selon la revendication 11, caractérisée en ce que le marquage est réalisé à l'aide d'un marqueur de détection fluorescent, radioactif, luminescent, phosphorescent, chimique ou enzymatique.
- 15 13. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'étape de récupération, sélection ou d'isolement est réalisée par cytométrie de flux, chromatographie d'affinité, FACS, MACS ou D/MACS.
- 20 14. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le mammifère est un être humain.
- 25 15. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la population cellulaire provient d'un tissu choisi parmi la moelle épinière, la rate, le foie, le thymus, du sang ayant ou non été préalablement enrichi en lymphocytes T, du sang de cordon ombilical, du sang périphérique fœtal, de nouveaux-nés ou d'adulte, d'une tumeur, d'un site inflammatoire, d'un organe transplanté ou d'une culture de cellules établie avec l'un ou l'autre desdits tissus.
- 30 16. Méthode d'identification et/ou de quantification de lymphocytes T suppresseurs dans une population cellulaire, comprenant l'exposition de ladite population cellulaire à un ligand spécifique de THY-1 et la détermination et/ou la

9. Méthode selon l'une des revendications 4 à 8, caractérisée en ce que le ligand est immobilisé sur un support ou placé en solution.
- 5 10. Méthode selon la revendication 9, caractérisée en ce que le support est une colonne ou une bille, de préférence une bille magnétique.
11. Méthode selon l'une des revendications 4 à 10, caractérisée en ce que le ligand est marqué.
- 10 12. Méthode selon la revendication 11, caractérisée en ce que le marquage est réalisé à l'aide d'un marqueur de détection fluorescent, radioactif, luminescent, phosphorescent, chimique ou enzymatique.
- 15 13. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que l'étape de récupération, sélection ou d'isolement est réalisée par cytométrie de flux, chromatographie d'affinité, FACS, MACS ou D/MACS.
- 20 14. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que le mammifère est un être humain.
- 25 15. Méthode selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisée en ce que la population cellulaire provient d'un tissu choisi parmi la moelle osseuse, la rate, le foie, le thymus, du sang ayant ou non été préalablement enrichi en lymphocytes T, du sang de cordon ombilical, du sang périphérique fœtal, de nouveaux-nés ou d'adulte, d'une tumeur, d'un site inflammatoire, d'un organe transplanté ou d'une culture de cellules établie avec l'un ou l'autre desdits tissus.
- 30 16. Méthode d'identification et/ou de quantification de lymphocytes T suppresseurs dans une population cellulaire, comprenant l'exposition de ladite population cellulaire à un ligand spécifique de THY-1 et la détermination et/ou la

quantification de la formation d'un complexe entre le ligand et les cellules, la formation de tels complexes indiquant la présence et/ou la quantité de lymphocyte T suppresseurs au sein de la population cellulaire.

- 5 17. Méthode de production d'une composition pharmaceutique, comprenant :
- (a) l'obtention d'un échantillon biologique comprenant des lymphocytes T,
  - (b) la sélection des lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1 au sein de cet échantillon biologique, et
  - (c) le conditionnement desdits lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1
- 10 dans un adjuvant ou un milieu acceptable sur le plan pharmaceutique.
18. Méthode de production d'une composition pharmaceutique, comprenant :
- (a) l'obtention d'un échantillon biologique comprenant des lymphocytes T,
  - (b) la déplétion des lymphocytes T exprimant l'antigène THY-1 au sein de cet échantillon biologique, et
  - (c) le conditionnement desdits lymphocytes T obtenus n'exprimant pas
- 15 l'antigène THY-1 dans un adjuvant ou un milieu acceptable sur le plan pharmaceutique.
- 20 19. Utilisation d'un ligand spécifique de l'antigène Thy-1 pour sélectionner, identifier, trier ou préparer, in vitro ou ex vivo, des lymphocytes T suppresseurs.
20. Utilisation d'un ligand spécifique de l'antigène Thy-1 pour préparer une composition diagnostique destinée à sélectionner, identifier ou quantifier in vivo
- 25 des lymphocytes T suppresseurs.
21. Utilisation d'un ligand spécifique de l'antigène Thy-1 pour préparer une composition thérapeutique destinée à modifier, stimuler ou supprimer in vivo des lymphocytes T suppresseurs.
- 30 22. Lymphocyte T humain isolé, caractérisé en ce qu'il présente une activité suppressive et en ce qu'il exprime les marqueurs CD8 et THY-1.



23. Composition cellulaire comprenant au moins, 50, 60, 70, 80, 85, 90 ou 95% de cellules T CD8+THY-1+.

5 24. Lymphocyte T selon la revendication 22, caractérisé en ce qu'il est modifié génétiquement à l'aide d'un vecteur viral.

10 25. Composition pharmaceutique caractérisée en ce qu'elle comprend au moins un lymphocyte T suppresseur selon l'une des revendications 22 à 24 et un adjuvant ou un milieu acceptable sur le plan pharmaceutique.

15 26. Utilisation d'un lymphocyte T ou d'une population de lymphocytes T selon l'une des revendications 22 à 24 pour la préparation d'une composition destinée à la mise en œuvre d'une méthode thérapeutique.

27. Utilisation selon la revendication 27, caractérisée en ce que la composition est destinée à être utilisée comme vaccin.

20 28. Utilisation selon la revendication 27 pour la préparation d'une composition destinée au traitement d'une tumeur, d'une maladie auto-immune, d'une allergie, d'une maladie du greffon contre l'hôte, d'une maladie inflammatoire, d'un diabète de type I, d'une infection virale ou bactérienne, à la reconstitution immune ou à l'induction d'une tolérance en cas de transplantation de cellules souches, tissus ou organe chez un mammifère.

25 29. Kit pour isoler ou caractériser des lymphocytes T suppresseurs, comprenant un ligand spécifique de Thy-1, placé en solution ou sur un support, ainsi que, éventuellement, des réactifs pour la détection du ligand.

1/5

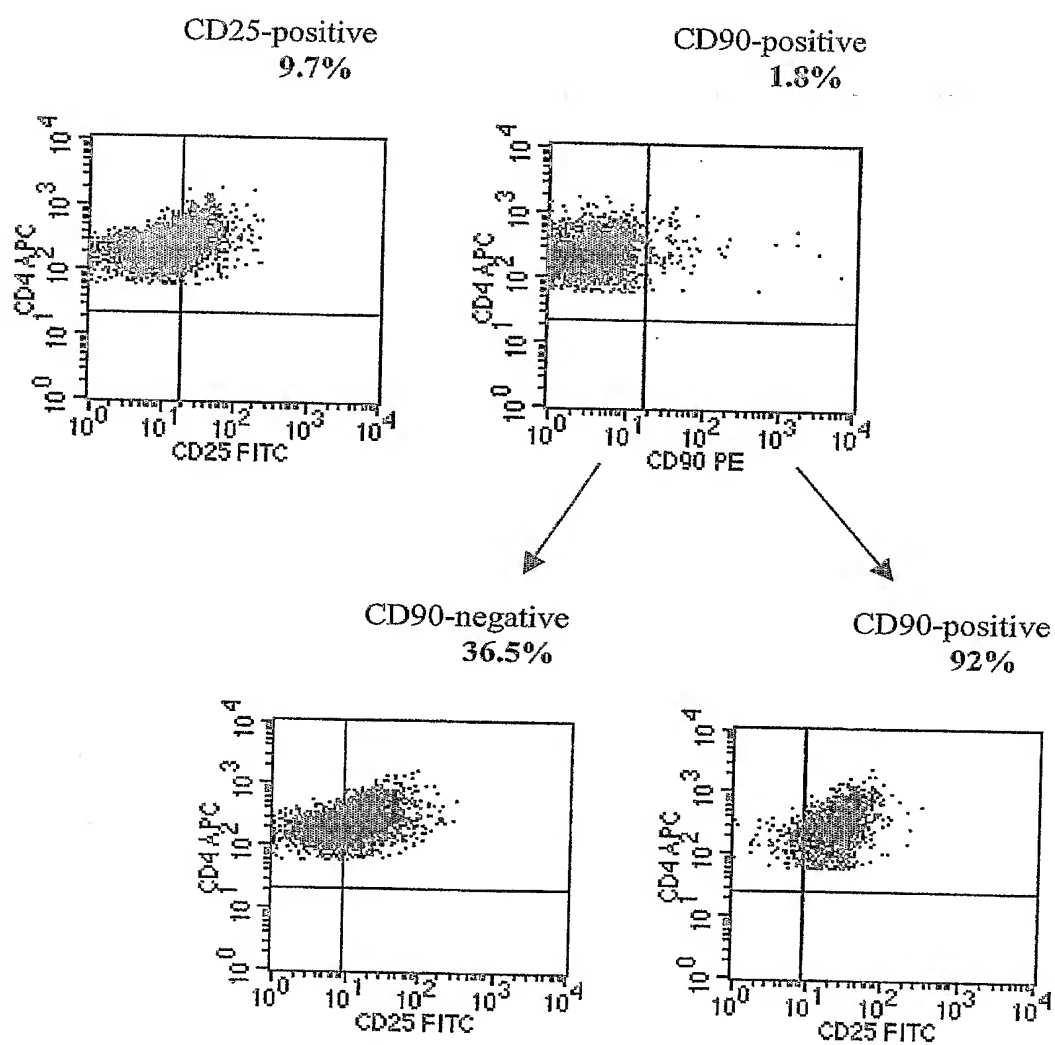


Figure 1A

2/5

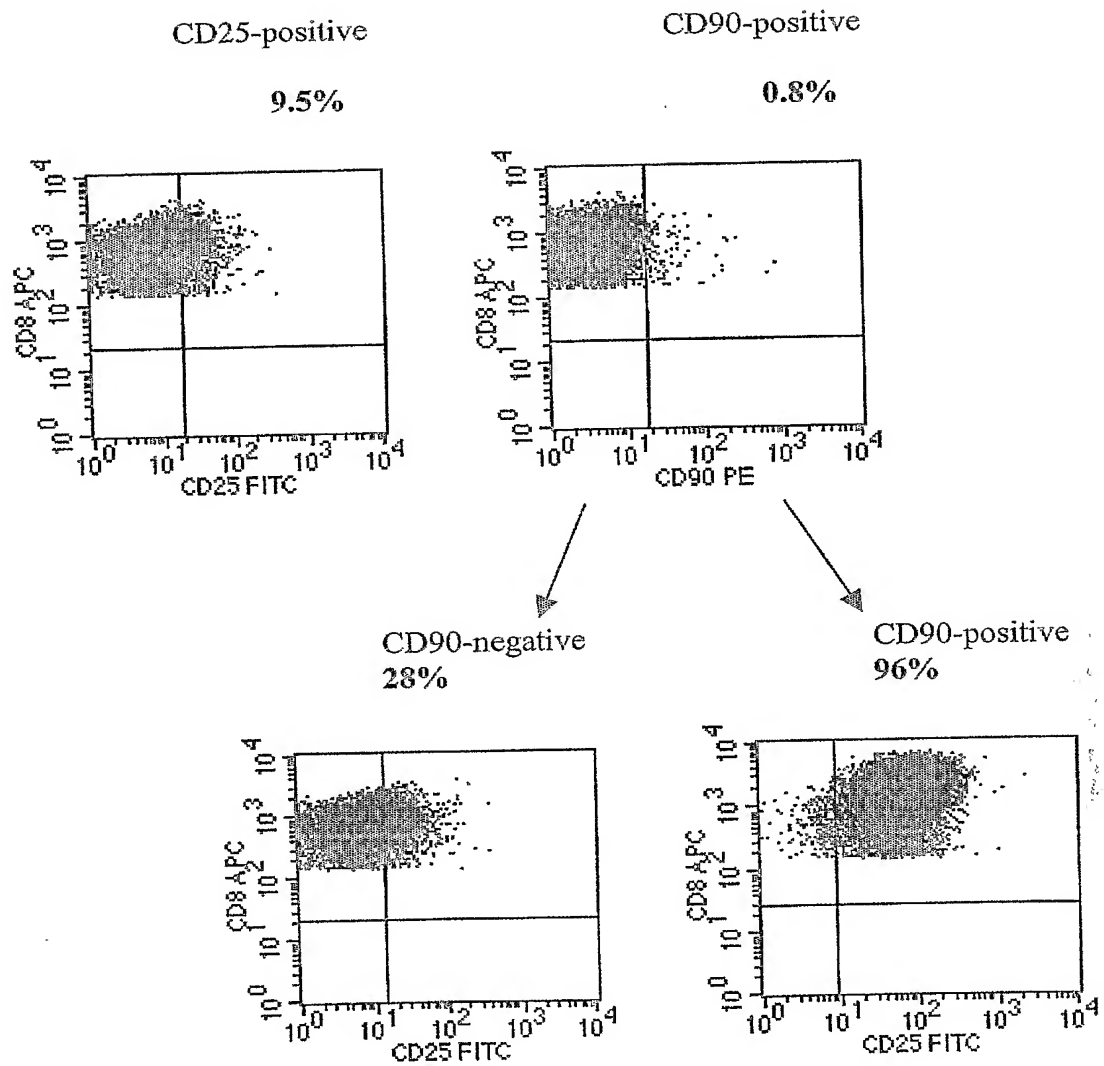


Figure 1B

3/5

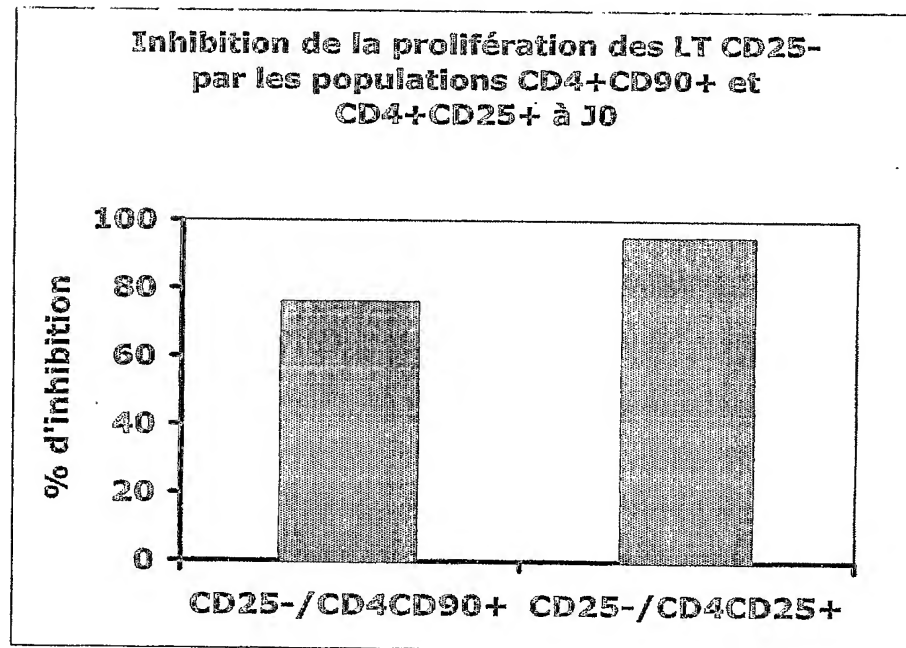


Figure 2

4/5

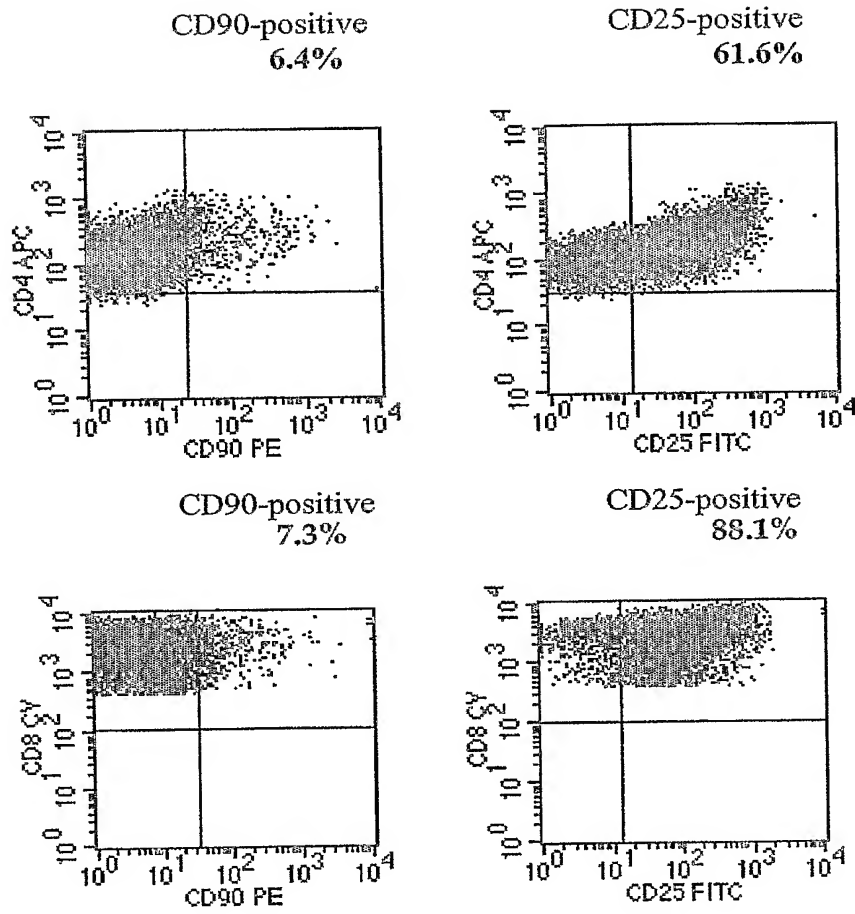


Figure 3

5/5

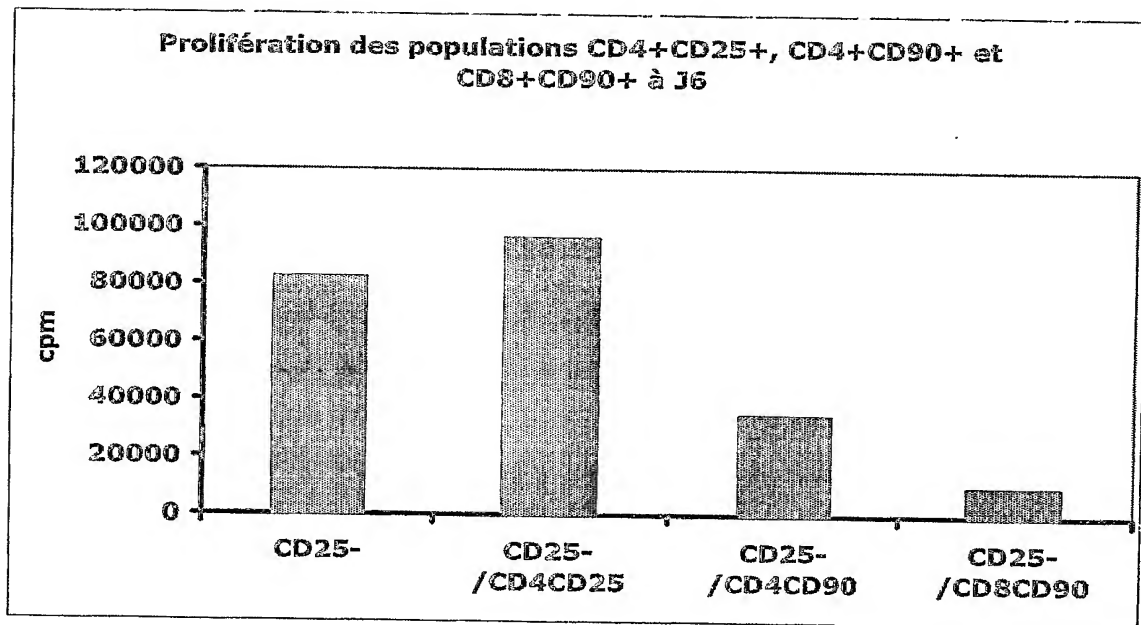


Figure 4



DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

## BREVET D'INVENTION

## CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11235\*03

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1../1..

(À fournir dans le cas où les demandeurs et  
les inventeurs ne sont pas les mêmes personnes)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 @ W / 270601

Vos références pour ce dossier (facultatif)		B0247FR
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		0315360
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)		
Méthode d'identification et de préparation de lymphocytes T régulateurs/suppresseurs, compositions et utilisations		
LE(S) DEMANDEUR(S) :		
ASSISTANCE PUBLIQUE, HOPITAUX DE PARIS		
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) :		
1 Nom		KLATZMANN
Prénoms		David
Adresse	Rue	11, Rue du Tage
	Code postal et ville	75013 Paris
Société d'appartenance (facultatif)		
2 Nom		LEMOINE
Prénoms		François
Adresse	Rue	220, Rue de Javel
	Code postal et ville	75015 Paris
Société d'appartenance (facultatif)		
3 Nom		
Prénoms		
Adresse	Rue	
	Code postal et ville	
Société d'appartenance (facultatif)		
S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez plusieurs formulaires. Indiquez en haut à droite le N° de la page suivi du nombre de pages.		
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire)		
BECKER Philippe CPI N°97-0800		



PCT/FR2004/003374

